

《原著》

微小コロニー検査装置による 一般生菌数定量精度の検証と実用化の可能性

松尾 一生^{1,2*} 星指 洋平^{1,2} 福岡 瑞紀^{1,2}
森山 誠^{1,2} 海谷 慎一³ 岸本 満^{2,4}

【要旨】

迅速かつ高精度の蛍光染色法による微生物微小コロニー検査装置「コロコロミー」による食品に対する生菌数カウントの結果を、標準培養法と比較した。培養6時間後に「コロコロミー」を使用し、生野菜、鶏肉、豚肉、および牛肉をそれぞれ検査した。4種類の生食材にたいして、48時間培養を行った標準検査法と比較した結果、2つの培養法におけるカウント数は線形相関を示し、単回帰分析における決定係数 R^2 はそれぞれ0.90, 0.72, 0.62及び0.48であった。この結果は、「コロコロミー」が食品管理における迅速かつ高感度の細菌検査に資する検査装置として活用できるためにはデータの蓄積が必要であることを示した。

牽引用語： 蛍光染色 微小コロニー法、マイクロコロニー法 メンブレンフィルタ法
微生物管理 培養時間

【緒言】

日本国内には、非加熱で摂食する食品が多く流通しており、これらの食品の安全性を確かめるために食品中の微生物検査が行われているものの、微生物汚染による食中毒を完全に防止するのは難しい。厚生労働省は2018年度の食中毒発生数を事件数で1,330件、患者数で17,282名と報告しているが、このうち細菌を原因とするものは事件数で467件、患者数で6,633名と、事件数では第2位、患者数ではウイルスを原因とするものに次ぐ第2位である¹⁾。さらに、この統計数は医療機関からの報告数のため、軽い症状の患者からは診断や報告がされていないと考えられ、実際の患者数は、原因となる病原細菌により40倍～450倍あるとする調査結果も存在す

る²⁾。

このような微生物汚染への対策として、2018年6月に食品衛生法が改正され、全ての食品事業者に対して、HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）に沿った衛生管理が制度化されることとなり、今後、日本国内での食品衛生の管理体制が大きく変動することが予想される。

これまで食品衛生法に基づいた公定法で検査を行った場合、一般生菌数の検査では培養時間は48時間必要となり、その他の検査となればさらに時間を要する場合もある。検査に時間がかればかかるほど影響範囲は大きくなり、一部の食品では出荷後に検査が行われていることから公定法よりも早く結果がわかる迅速検査法の確立が不可欠な時代となっている。そのため、

1. 有限会社森山環境科学研究所
2. 名古屋学芸大学 健康・栄養研究所
3. 株式会社榎屋 技術開発本部 研究開発センター
4. 名古屋学芸大学 管理栄養学部

従来の培養法等による微生物検査に代わる迅速検査法および装置の開発が求められている。

食品の微生物検査において、もっとも一般的に使用されるのは寒天平板を使用した混釈平板培養法である。培養法による微生物検査は培地上に生育する生菌のみを対象としてカウントすることが可能で、且つコロニーを回収することで分離株を獲得し、遺伝子学的、生化学的性状などの分類学的な性状を調べることが可能である。

しかし、これらのメリットと比較し、日常的な業務として微生物検査を実施する場合、培養したコロニーのカウント数を得るためには一般的に数十時間の培養が必要であるため、これらの業務を恒常的に行う場合、休日を含んだの検査や、保管場所などの対応に検査従事者が大きな労力を払う必要がある。

そこで、ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）法³⁾、PCR（Polymerase Chain Reaction）法^{4, 5)}、LAMP（Loop-mediated isothermal AMPlification）法⁶⁾、イムノクロマトグラフィー法⁷⁾、TOF-MS（Time-of-Flight Mass Spectrometer）法^{8, 9)}、ATP ふき取り検査法¹⁰⁾、タンパク質ふき取り検査法¹¹⁾、CO₂消費測定法、定量 PCR 法¹²⁾、フローサイトメトリー法^{13, 14)}、顕微鏡測定^{15, 16)}、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法¹⁷⁻²⁰⁾、微小コロニー検査法²¹⁻²⁶⁾、発熱量測定法²⁷⁾、酸素消費量測定法²⁸⁾ など、食品中の衛生細菌を迅速かつ精度良く検出することを目的として、特定細菌の検査・分類学的調査、汚染度の調査、細菌数カウントなどの様々な技術が検証されている。

特に、微小コロニー検査法は、公定法の測定対象である微生物のコロニーが生育初期段階である時点で測定することで、コロニー形成能を持つ生菌を迅速に検査可能である。微小コロニーの検出には、メンブレンフィルタ培養法と蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法や蛍光染色法などが組み合わせて使用され、通常のコロニーカウントの結果を迅速に得ることが可能であることが知られている。

しかし、染色によって菌を殺菌した場合、検査後の釣菌が不可能であることや、食品検査に

おける食品の繊維質や粒子などによる微小な固形異物の混入、油や食材の溶出液の影響による染色剤への影響、自家蛍光物質による蛍光観察への影響などの問題があることも知られており、検証試験についても、擬似的に菌を混入した模擬試験や、溶液検体における測定結果の検証、顕微鏡レベルの検査よりも培養時間を伸ばして異物との差をわかりやすくして行う培養試験などが多く、混入した異物と同サイズの微小コロニーを検査する手段については考慮されている報告はすくない。

微生物微小コロニー検査装置「コロコロミー」は、メンブレンフィルタ培養法と非殺菌性の蛍光染色剤を使うことで、微生物の蛍光染色反応の継時的な変化を測定し、異物や溶出液の影響を低減して微生物の微小コロニーのみを測定するように開発された装置である。

本研究では、微生物微小コロニー検査装置「コロコロミー」を用いて、食品検体中の生菌数を微小コロニーカウントにより測定し、その生菌数の測定精度について、標準培養法を用いたコロニーカウント数と比較し、その実用性について検討した。

【方法】

1. 測定検体

検査対象の食品は2017年4月～2017年7月に愛知県内小売店で購入した野菜類28検体、肉類51検体を用いた(表1)。各食材は使用までは冷蔵または冷凍で保存し検査を行った。

表1 測定検体

種類	検体名	検体数
野菜類	イタリアンサラダ	4
	キャベツ	6
	ネギ	4
	白菜	1
	水菜と大根のサラダ	4
	ミックスサラダ	4
	レタス	5
肉類	鶏肉	17
	豚肉	17
	牛肉	17

2. 細菌数測定法

2.1 微小コロニー検査法

検査は微生物微小コロニー検査装置「コロコロミー」(槌屋製)を用いて行った(図1)。

食品検体は、滅菌したハサミなどで細かく切断した後、ストマッカー袋(アテクト製)に10 gもしくは25 gを回収し、検体の9倍量のリン酸緩衝生理食塩水(Pro-media MV2-1000PBS、エルメックス社製)と混合した。さらに、ストマッカー袋を、ストマッカーにセットして、250 rpm、60 secで破碎処理を行い、10倍希釈液とした。10倍希釈液1 mLと希釈水9 mLを混合し、食品検体の 10^6 倍希釈液が得られるまで希釈を繰り返した。希釈液には市販の滅菌希釈水(D9PBS、3Mヘルスケア社製)を用いた。希釈液1 mL分をセルロース混合エステル製メンブレンフィルタ(HABG02500、Merck Millipore社製)でろ過し、細菌を捕集した。メンブレンフィルタを標準寒天平板(標準寒天培地、日水製薬社製)上へ載置し6時間培養した。培養後、培地を取り出し、メンブレンフィルタ上の微小コロニーを染色剤で染色し、微小コロニーの測定を行った。染色剤には非殺菌性のFDA系蛍光染色剤(EZFREAG57、Merck Millipore社製)を、メンブレンフィルタを固定するケースには47 mmプラスチックシャーレにフィルムパレット(槌屋製)をセットした測定用ケースを用いた。染色の手順は、まず、染色剤を測定用ケース上へ50 μ L滴下し、培養後の培地上からメンブレンフィルタをピンセットで回収して

測定用ケース上へ載置した。メンブレンフィルタが染色剤で湿潤したことを確認後、迅速に測定用ケースを「コロコロミー」へセットして、微小コロニーを測定した。

「コロコロミー」はセットされた計測フィルタに490 nmの励起光を照射し、520 nm以上の蛍光を検出して撮影する。継時的なデータを取るため、撮影タイミングを0分、1分、2分、3分に設定し、撮影後、「コロコロミー」で撮影した画像をソフトウェア上で処理し、微生物の蛍光点のみを抽出した。細菌のカウントは「コロコロミー」付属ソフトウェアによる自動カウントを用いて行った。測定は $n=2$ で行い、1 g当たりの微小コロニー数を計算した。

2.2 標準培養法

標準培養法は、通常の混釈平板培養法と相関性が確認されている3MTMペトリフィルムTM培地を用いて行った^{29,30)}。

3MTMペトリフィルムTM培地ACプレート(3Mヘルスケア社製)に希釈液を添加し、35度、48時間培養した。各希釈倍率で測定は $n=2$ で行い、培養後のコロニーカウントは目視により行い、カウント数より1 gあたりの生菌数を計算した。

3. 統計解析

コロコロミーおよび標準培養法で検出されたコロニー数の相関は単回帰分析で行った。P値<0.01を有意水準とした。

【結果】

表2、表3に野菜類、肉類に対する「コロコロミー」を用いた検査結果と、培養法で得られたカウント結果を示した。

図2に野菜類に対する「コロコロミー」を用いた検査結果と、培養法で得られたカウント結果を比較したグラフを示した。野菜類28検体に対する決定係数は0.90と非常に強い正の相関を示した。回帰式の勾配係数は1.16と、「コロコロミー」で検出したカウント結果は標準培養法の結果に比べ若干低い値を示した。



図1 「コロコロミーの外観」

表2 野菜類サンプルの「コロコロミー」及び「従来培養法」で検出されたコロニー数

検体名	コロコロミー 測定値	ペトリフィルム AC (一般生菌)【CFU/g】
キャベツ. 1	375	2700
キャベツ. 2	1100	2500
ネギ. 1	41300	430000
ネギ. 2	159000	820000
ネギ. 3	1280000	3800000
ネギ. 4	52500	850000
ミックスサラダ. 1	2245	3900
ミックスサラダ. 2	2180	900
ミックスサラダ. 3	2120	9200
ミックスサラダ. 4	2350	2300
レタス. 1	1390	3900
レタス. 2	3300	15000
レタス. 3	3250	9000
レタス. 4	1670	4300
レタス. 5	1980	12000
水菜と大根のサラダ. 1	1220	7600
水菜と大根のサラダ. 2	2745	15000
水菜と大根のサラダ. 3	14850	38000
水菜と大根のサラダ. 4	11950	43000
イタリアンサラダ. 1	8300	20000
イタリアンサラダ. 2	1850	6700
イタリアンサラダ. 3	27775	39000
イタリアンサラダ. 4	11100	48000
キャベツ. 3	335	260
キャベツ. 4	330	600
キャベツ. 5	350	370
キャベツ. 6	380	370
白菜	20600	110000

表3 肉類サンプルの「コロコロミー」及び「従来培養法」で検出されたコロニー数

検体名	コロコロミー 測定値	ペトリフィルム AC (一般生菌)【CFU/g】
鶏肉. 1	11750	18000
鶏肉. 2	8100	11000
鶏肉. 3	24750	52000
鶏肉. 4	12100	10000
鶏肉. 5	3450	5000
鶏肉. 6	7150	11000
鶏肉. 7	6950	7500
鶏肉. 8	9550	7800
鶏肉. 9	29000	56000
鶏肉. 10	19100	38000
鶏肉. 11	11050	25000
鶏肉. 12	7550	23000
鶏肉. 13	15650	68000
鶏肉. 14	7600	22000
鶏肉. 15	26000	33000
鶏肉. 16	113000	110000
鶏肉. 17	25725	33000

検体名	コロコロミー 測定値	ペトリフィルム AC (一般生菌)【CFU/g】
豚肉. 1	190000	1300000
豚肉. 2	56500	280000
豚肉. 3	125500	1400000
豚肉. 4	29000	17000
豚肉. 5	34000	21000
豚肉. 6	49000	17000
豚肉. 7	35500	31000
豚肉. 8	38650	59000
豚肉. 9	34000	92000
豚肉. 10	48000	220000
豚肉. 11	26500	170000
豚肉. 12	30750	120000
豚肉. 13	17300	11000
豚肉. 14	30500	49000
豚肉. 15	19000	77000
豚肉. 16	16100	22000
豚肉. 17	7250	12000

検体名	コロコロミー 測定値	ペトリフィルム AC (一般生菌)【CFU/g】
牛肉. 1	219500	540000
牛肉. 2	221000	280000
牛肉. 3	1595000	1800000
牛肉. 4	595000	410000
牛肉. 5	40000	140000
牛肉. 6	480000	240000
牛肉. 7	655000	590000
牛肉. 8	640000	830000
牛肉. 9	26000	8700
牛肉. 10	53500	8800
牛肉. 11	26950	5000
牛肉. 12	28500	6200
牛肉. 13	39500	96000
牛肉. 14	32500	72000
牛肉. 15	13950	60000
牛肉. 16	4500	55000
牛肉. 17	6750	160000

図3に肉類に対する「コロコロミー」を用いた検査結果と、標準培養法で得られたカウント結果を比較したグラフを示した。肉類51検体に対する決定係数は0.58で、回帰式の勾配係数は0.86だった。決定係数は野菜類に比べ低い値を示し、ばらつきが大きくなったものの、有意の正の相関関係を示していた。さらに、肉類について、各検体の種類による影響を考慮し、鶏肉、豚肉、牛肉の検査結果を別々に計算しなおした(図4、図5、図6および表4)。

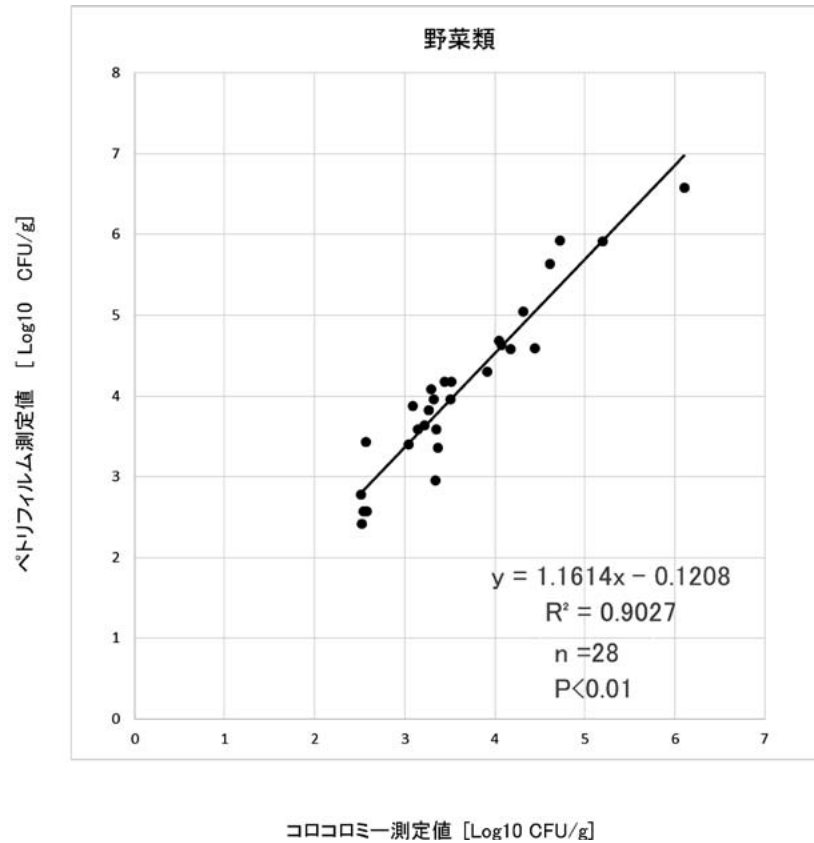


図2 野菜類サンプルの「コロコロミー」および「従来培養法」で検出されたコロニー数の結果

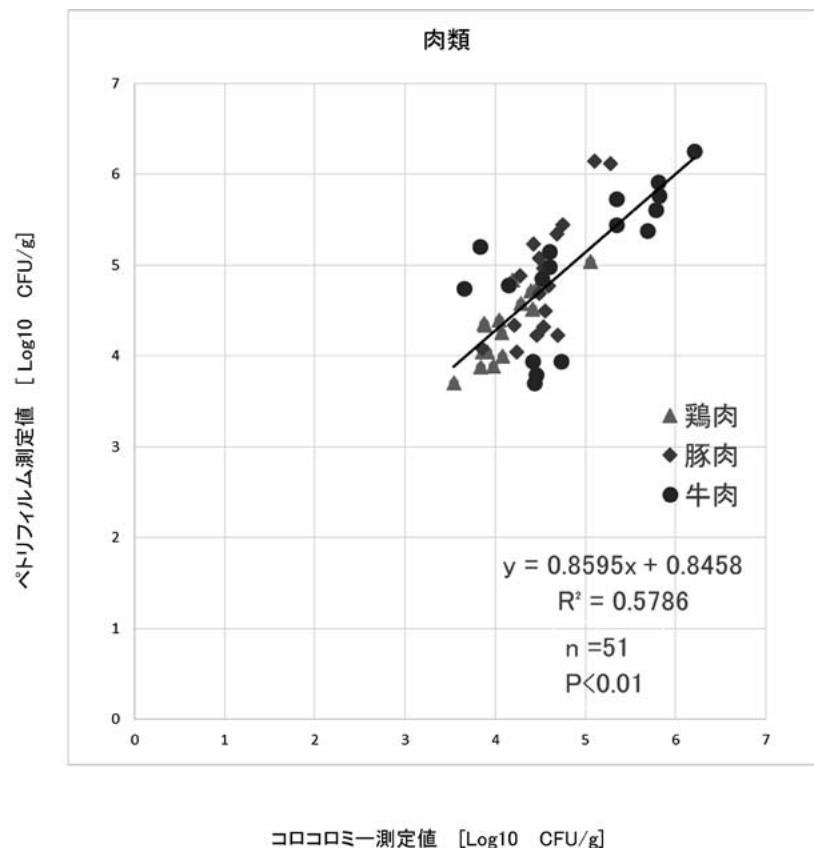


図3 肉類サンプルの「コロコロミー」および「従来培養法」で検出されたコロニー数の結果

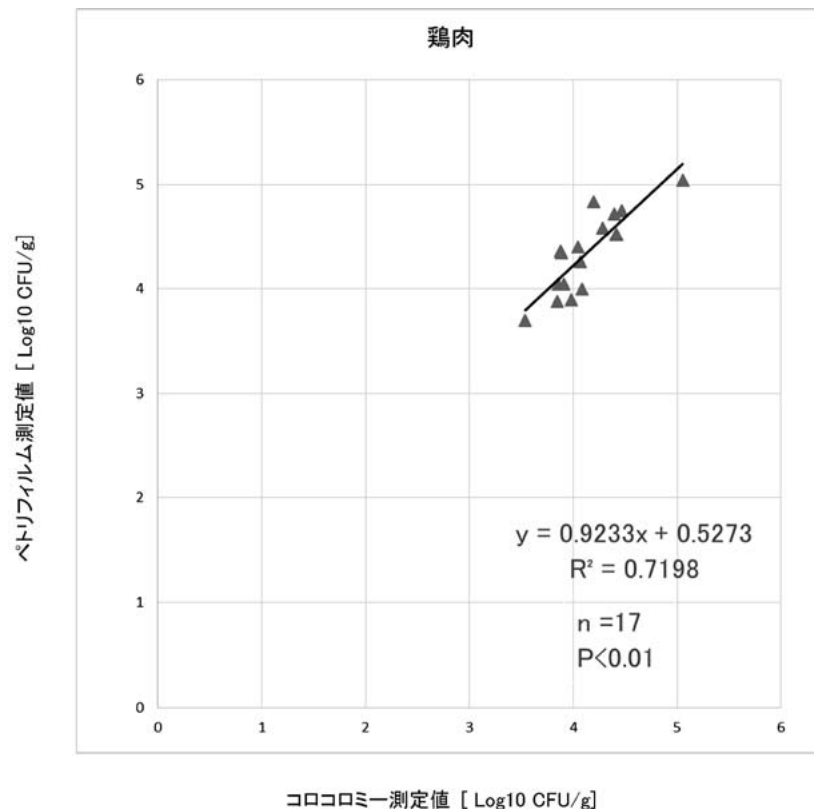


図4 鶏肉サンプルの「コロコロミー」および「従来培養法」で検出されたコロニー数の結果

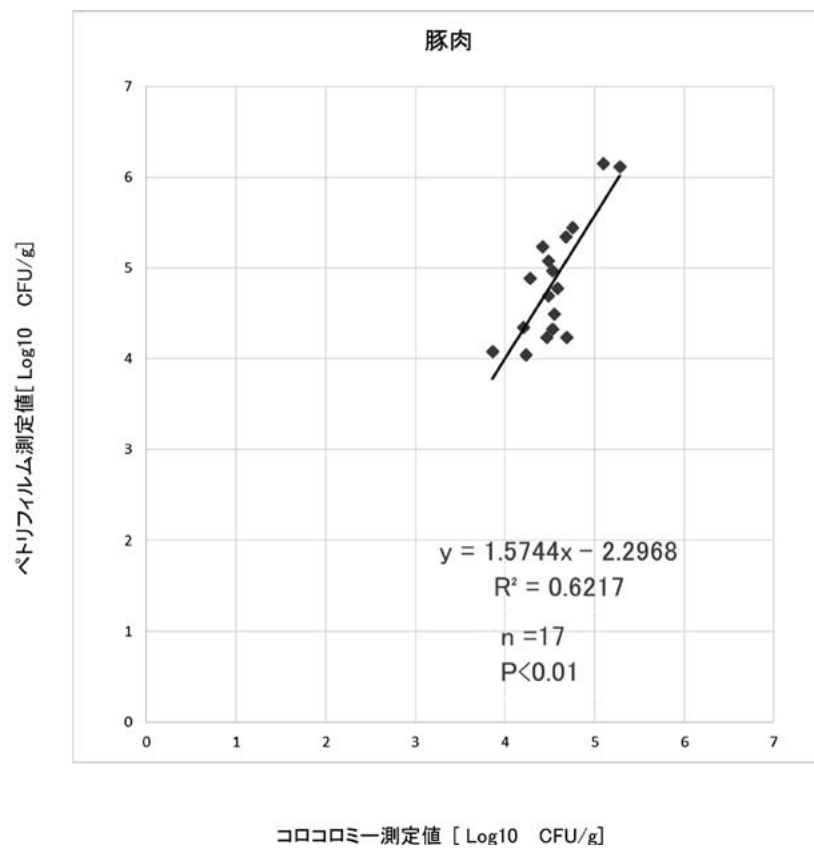


図5 豚肉サンプルの「コロコロミー」および「従来培養法」で検出されたコロニー数の結果

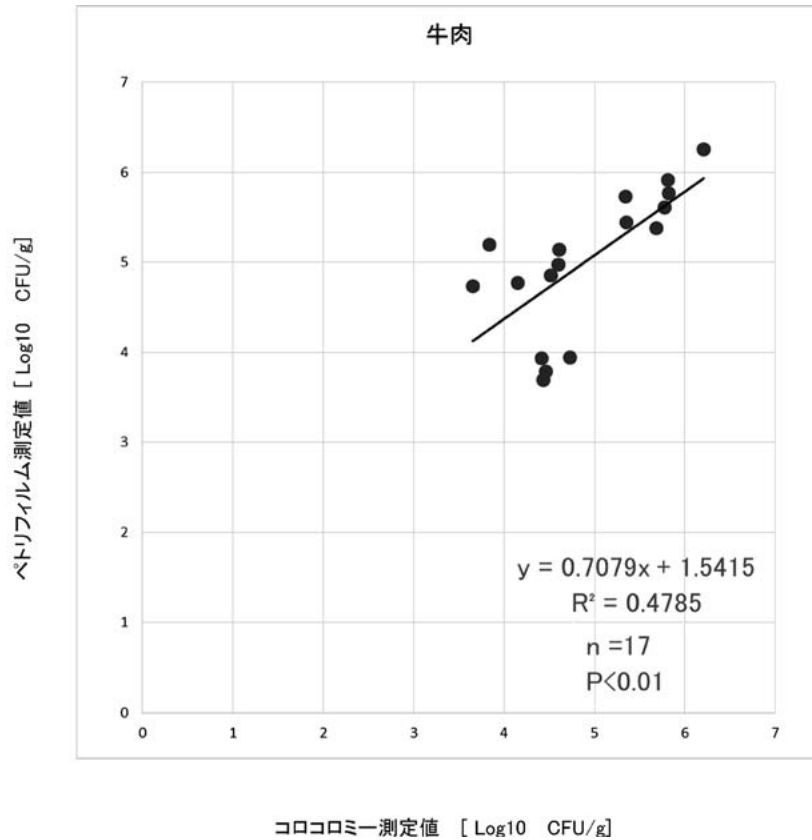


図6 牛肉サンプルの「コロコロミー」および「従来培養法」で検出されたコロニー数の結果

表4 食品ごとの決定係数、相関係数および有意確率

	R ²	r	β ₀	P	n
野菜類	0.9027	0.9501	1.1614	<0.01	28
肉類	0.5786	0.7607	0.8595	<0.01	51
鶏肉	0.7198	0.8484	0.9233	<0.01	17
豚肉	0.6217	0.7885	1.5744	<0.01	17
牛肉	0.4785	0.6917	0.7079	<0.01	17

R²: 決定係数、r: 相関係数、β₀: 勾配、P: P 値 (有意確率)、n: サンプル数

鶏肉における「コロコロミー」の検査結果と培養法の検査結果は決定係数が0.72で、勾配係数は0.92だった。豚肉に対する結果は決定係数が0.62で勾配係数は1.57、牛肉に対する結果は決定係数が0.48で勾配係数は0.71だった。いずれも有意の正の相関関係を示した。

勾配係数にばらつきがあり、特に豚肉においては「コロコロミー」の結果が少なく培養法の間に1.5倍近い差があることが示された。

【考察】

複数の細菌が混在している検体を、微小コロニー検査を用いて検査する場合、微小コロニーまで生育が進むものの、目視可能となるサイズまではコロニーが増殖しない細菌があることが知られている³¹⁾。

この場合、微小コロニー数は標準培養法におけるコロニー数に対して多くなる。

しかしながら、野菜類に対して微小コロニーの迅速検査を行った結果、微小コロニー検査の結果と標準培養法の結果は、決定係数で0.90と

非常に良好な結果が得られたが、その勾配係数は1.16と約1.2倍の値を示した。

一方で、細菌の増殖速度が細菌種により異なることは常識として知られており、細菌種による増殖の差がコロニー形成速度の差となることも自明である。また、今回の試験では、通常の業務時間である朝9時から夕方5時までの8時間で検査を終了させることを想定して、培養時間を6時間に設定した。

よって、一部の微生物に対して、微小コロニーが発現するほどの培養時間が取れないので、コロニーカウント数は標準培養法に比べて低くカウントされると推測される。特に、微生物微小コロニーの検査では、メンブレンフィルタ培養法を行うため、混釈平板培養法やシート培地を用いた簡易培養法と異なり、細菌はメンブレンフィルタの表面に存在することになる。この際、検体内に存在する細菌種の増殖速度の差により、増殖の遅いコロニーが生育するまで培養を行うと、増殖の速いコロニーが増殖の遅いコロニーを覆ってしまう可能性があり、十分な培養を行うことは難しい。とくに放線菌や芽胞菌などコロニーが特徴的に広がる細菌を含む場合、その影響が顕著であり、微生物微小コロニーの検査においては、培養時間を長期にしすぎることが、必ずしも正確なカウントに直結するわけではない。

そのため、今回の試験のように、食品種類ごとに、検量線を引き、正確に短時間培養後の微小コロニー検査結果が、標準培養法の結果を近似できるかを確かめることは重要である。今回の野菜類に対する試験結果を見ると、勾配係数は若干低い値を示したものの、決定係数は高く、グラフ上でも有意の正の一次相関を示したことから、野菜類に対して「コロコロミー」を用いた微小コロニー検査を行うことで、迅速検査が可能であることを明らかにすることができた。

食用の肉類についての迅速検査を行った結果について、検査したすべての肉類に対する検査結果をグラフにまとめたところ、その決定係数は0.58、勾配係数は0.86であった。決定係数 R 2

に対する効果量の目安は、その測定対象によって変動はあるものの、一般的な指標として、0.26以上で効果大であるとされている³²⁾。

また、統計学の目安として使用されるギルフォードのルールにおいては、相関係数が0.9以上を非常に強い相関、0.7以上を強い相関としており、これは決定係数に変換するとそれぞれ0.81、0.49を基準とすることになる³³⁾。

肉類の結果を見ると決定係数は0.58と、相関の基準となる0.26を上回っており、相関性があることがわかる。ギルフォードのルールと比較しても、強い相関関係を示す決定係数0.49を上回っているが、野菜類の決定係数である0.90と比較すると、低い値である。

この差が何を原因としているのかを考えると、野菜類の迅速検査は基本的に水洗いされた生野菜を用いており、その種類は全て葉茎菜である。これは葉菜類の検査で検出される細菌種が一定であり、迅速検査における回帰式が葉菜類の種類に関わらず一定であったとも考えられる。

対して、鶏肉、豚肉、牛肉の肉類に対する微生物検査は、その肉類の種類によって存在する細菌種の割合が異なることが知られているため、肉類に対する迅速検査と標準培養法の決定係数が野菜類に比べて低い理由として、肉類の種類による影響があるものと考えられた³⁴⁾。

そこで、肉類の種類に対して、個別に散布図を作成し、その決定係数を計算したところ、鶏肉、豚肉、および牛肉に対する決定係数はそれぞれ0.72、0.62及び0.48であり、鶏肉、豚肉の結果において、ギルフォードのルールに基づく強い相関関係を持つことが示された。この結果は、肉類に対して、より高い相関性を持たせた試験を行う場合、その肉類の種類ごとに検量線を引くことが有効であることを示している。

また、鶏肉と牛肉においては、勾配係数がそれぞれ0.92と0.71であり、迅速検査と標準培養法の間でかなり近似した値を示していたことが確認できた。決定係数は0.72と0.48を示しこの決定係数は野菜類の試験より低いものの、十分に相関性があると思われた。

豚肉の試験においては、決定係数は0.62と上

昇したが、勾配係数は1.57と野菜類を含めても顕著に高く、迅速検査においては一部の細菌しか検査できていない可能性が示唆された。さらに、鶏肉、牛肉と大きく勾配係数が異なっていたことから、豚肉が肉類全体の迅速検査の相関性が低い値となった原因の一因を担っていたことが示唆される。

これらの結果は、肉類について、各肉類の種類ごとに検量線を引き直すことで、より精度良く迅速検査を行うことができる事を示している。また、肉類の勾配係数は肉類の種類により大きく異なり、全ての肉類を一つの検量線でまとめて検査してしまうと、標準培養法の結果とずれてしまう可能性が示された。

【結論】

食品中の微生物検査を行うための装置は数多く開発・検討されており、今回我々が検討した「コロコロミー」もその一つである。本報告では「コロコロミー」を用いて、野菜類、肉類に対する微生物検査を行い、標準培養法と比較することで、以下のような結果を得ることができた。

野菜類に対して、微小コロニー検査と標準培養法の間に、非常に高い相関性が得られ、培養6時間で迅速検査が可能であることが分かった。

肉類に対して、野菜類と同様に微小コロニー検査と標準培養法の間に相関関係が見られたが、相関性は決定係数で0.5程度であり、各肉類に対して個別に検量線を引き直すことで決定係数を向上させることができた。

今回検証した結果は、微小コロニー検査法を標準培養法の代替として使用する場合、事前に検量線を引き相関性を確かめる必要があることを示している。

従来、微小コロニー検査法は迅速検査法の一環として実証試験が行われているが、今回の結果からは、特に「コロコロミー」を用いることで、培養6時間のメンブレンフィルタ培養物を用いて、微小コロニーをカウントすることが可能であることが示された。

また、培養時間を短く設定した微小コロニー検査法では、検査対象ごとの検量線の作成が重要であり、その検量線を用いることで、標準培養法の結果を推定することが可能である。ただし、食品およびその由来によって検量線を作成する必要がある。

以上のことから、「コロコロミー」は、標準培養法による生菌数検査を、準備からカウントまでを含めて8時間程度まで短縮することが可能であると考えられるが、肉類については種類ごとの検量線を作成する必要があり、微生物検査の迅速化に資する検査装置として活用の幅を広げられるようデータの蓄積が必要である。

【謝辞】

本研究は、平成28年度「新あいち創造研究開発 補助金」事業の助成を受けて実施した。また平成28、29年度「名古屋学芸大学健康栄養研究所 研究実践課題」として実施した。

【利益相反】

海谷慎一（株式会社植屋の社員）

【参考文献】

- 1) 厚生労働省 食中毒統計資料, 2018
- 2) 森川馨 食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究. 厚生労働科学研究成果データベース, 2009
- 3) Tapchaisri, P., Wangroongsarb, P., Panbangred, W., *et al.* Detection of Salmonella contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 1999; 17 (1): 41-51.
- 4) 宮原美知子, 荒川英二. 食品からの *V. parahaemolyticus* 迅速検出法の検討. 防菌防黴, 2008; 36: 669-675.
- 5) Fu, Z., Rogelj, S., Kieft, L. T., Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 2005; 99 (1): 47-57.
- 6) Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C., *et al.* The application of loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiol.*, 2013; 36 (2): 191-206.
- 7) Zhao, X., He, X., Li, W., *et al.* Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. *African J. Microbiol.*, 2010; 4: 663-670.
- 8) Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R., *et al.* Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *Open Microbiol.*, 2013; 7: 135-141.
- 9) Hotta, Y., Sato, H., Hosoda, A., *et al.* MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in S10 and spc operons rapidly classified the *Sphingomonadaceae* as alkylphenol polyethoxylate-degrading bacteria from the environment. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012; 330 (1): 23-29.
- 10) Ukuku, O. D., Sapers, M. G., Fett, F. W., *et al.* ATP Bioluminescence Assay for Estimation of Microbial Populations of Fresh-Cut Melon. *Journal of Food Protection*, 2005; 68: 2427-2432.
- 11) 川崎晋, 山中俊介, 川本伸一. 蛋白質ふき取り法による食品製造現場での自主衛生検査の活用法とその有効性. 日本食品微生物学会雑誌, 2006; 23: 230-236.
- 12) Khan, I. U., Gannon, V., Kent, R., *et al.* Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *J. Microbiol. Methods*, 2007; 69: 480-488.
- 13) 田中孝, 土方智典, 伊藤晶子. *et al.* フローサイトメトリーによるヨーグルト中の酵母の迅速検出. 防菌防黴, 2010; 38: 797-801.
- 14) 田中孝, 土方智典, 上門英明. フローサイトメトリーによる牛乳中の大腸菌群迅速検出. 防菌防黴, 2011; 39: 71-75.
- 15) 荒井威吉, 澤山成行, 梨本一男. *et al.* 蛍光染色フィルタ法による生乳中の細菌数測定精度と実用性. *Milk Science*, 2006; 55: 31-36.
- 16) Niwa, R., Yoshida, S., Furuya, N., *et al.* Method for simple and rapid enumeration of total epiphytic bacteria in the washing solution of rice plants. *Can. J. Microbiol.*, 2011; 57: 62-67.
- 17) 山村隼志, 古泉綾子. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法によるカビの迅速検出. 防菌防黴, 2011; 39: 525-530.
- 18) Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., *et al.* Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. *Res. Microbiol.*, 2000; 151: 521-533.
- 19) 青井良平, 清水茂雅, 山崎浩司, *et al.* 培養併用蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を用いた汚染指標大腸菌の迅速定量検出. 日本食品科学工学会誌, 2011; 58: 483-489.
- 20) 山崎浩司. 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を応用した迅速細菌検査法の開発と食品微生物制御. 日本食品科学工学会誌, 2014; 61: 259-267.
- 21) 馬場貴志, 山口進康, 那須正夫. マイクロコロニー自動計数システムによる水環境中の生菌数の迅速計測. 防菌防黴, 2007; 35: 719-724.
- 22) Wang, X., Yamaguchi, N., Someya, T., *et al.* Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a micro-colony auto counting system. *Journal of Microbiological Methods*, 2007; 71: 1-6.
- 23) Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., *et al.* Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *J. Biosci. Bioeng.*, 2009; 108: 124-129.
- 24) Baumstummeler, A., Chollet, R., Meder, H., *et al.* Development of a nondestructive fluorescence-based enzymatic staining of microcolonies for enumerating bacterial contamination in filterable products. *J. Appl. Microbiol.*, 2011; 110: 69-79.
- 25) Osono, E., Kobayashi, E., Inoue, Y., *et al.* Rapid detection of microbes in the dialysis solution by the microcolony fluorescence staining method (Millflex quantum). *Biocontrol Sci.*, 2014; 19: 57-60.
- 26) 千原裕貴, 紙本和美, 左海順, *et al.* 6-carboxy-fluorescein diacetate を用いたマイクロコロニー法のバイオプロセスへの適用. 日本防菌防黴学会誌, 2015; 43: 457-461.
- 27) 坂宮章世, 田中晶善. 微生物熱測定と, その食品微生物学および土壌微生物学への応用. 日本熱測定学会, 2009; 36: 31-37.
- 28) 山梨秀己, 久保田裕美, 郡司明博, *et al.* DOX を用いた食品中のサルモネラ迅速検出法の検討. 日本食品微生物学会雑誌, 2004; 21: 160-167.
- 29) Ellis, P., Meldrum, R., Comparison of the compact dry TC and 3M petrifilm ACP dry sheet media methods with the spiral plate method for the examination of randomly selected foods for

- p>obtaining aerobic colony counts.
- J. Food. Prot.*
- , 2002; 65: 423-425.
- 30) Nelson, T. M., LaBudde, A. R., Tomasino, F. S., *et al.* Comparison of 3M Petrifilm Aerobic Count Plates to standard plating methodology for use with AOAC antimicrobial efficacy methods 955.14, 955.15, 964.02, and 966.04 as an alternative enumeration procedure: collaborative study. *J. AOAC. Int.*, 2013; 96: 717-722.
 - 31) Kawai, M., Yamaguchi, N., Nasu, M. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 86: 496-504.
 - 32) 水本篤, 竹内理. 研究論文における効果量の報告のために. 英語教育研究, 2008; 31: 57-66.
 - 33) Mukaka, M. M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi. Med. J.*, 2012; 24: 69-71.
 - 34) Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., *et al.* Prevalence of *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli*, and *Salmonella serovars* in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 67: 5431-5436.

Abstract

Experimental validation of the accuracy and applicability of the bioimaging microcolony counter to microbial examination tests

Issey Matsuo^{1,2*}, Youhei Hoshisashi^{1,2}, Mizuki Fukuoka^{1,2},
Makoto Moriyama^{1,2}, Shinichi Kaiya³, Michiru Kishimoto^{2,4}

A bioimaging microcolony counter “ColoColoMee” using membrane filtering method combining a fluorescent staining technique for rapid and sensitive bacteria detection, was compared with the standard technique for evaluation of the viable bacterial counts in foods. We investigated bacteria in foods using “ColoColoMee”, with raw vegetables, chicken, pork and beef, respectively. Using “ColoColoMee”, microcolonies could be detected after 6h of the incubation, compared to that after the conventionally used 48h incubation period. The results showed a linear correlation, and the decision coefficients R^2 with standard incubating technique (48h of incubation) with 4 kind of raw foods were 0.90, 0.72, 0.62 and 0.48, respectively. These results indicated that “ColoColoMee” is useful for rapid and sensitive bacteria detection in food quality control.

Keywords: Fluorescent dye staining, Microcolony detection method, Membrane Filter Method, Microbial control, Incubation time

1 Moriyama Environmental Wellness Laboratories

2 Institute of Health and Nutrition, Nagoya University of Arts and Sciences

3 Research and Technology Development Division, Tsuchiya Co., Ltd.

4 Department of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences